

5

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 445 385 A2**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 90123263.7

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 15/77, C12N 15/74,  
C12N 15/70**

22 Anmeldetag: 05.12.90

Der (Die) Mikroorganismus (Mikroorganismen) ist  
(sind) bei Northern Regional Research Center  
unter der (den) Nummer(n) B-15481-2-3  
hinterlegt worden.

30 Priorität: 03.03.90 DE 4006637

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
11.09.91 Patentblatt 91/37

64 Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

71 Anmelder: **Degussa Aktiengesellschaft**  
**Weissfrauenstrasse 9**  
**W-6000 Frankfurt am Main 1(DE)**

72 Erfinder: **Kassing, Friedrich**  
**Körnerstrasse 4**  
**W-4830 Gütersloh 1(DE)**  
Erfinder: **Schäfer, Andreas**  
**Bünderstrasse 33**  
**W-4800 Bielefeld 1(DE)**  
Erfinder: **Kalinowski, Jörn, Dr.**  
**Schlosshofstr. 123**  
**W-4800 Bielefeld 1(DE)**  
Erfinder: **Pühler, Alfred, Prof. Dr.**  
**Am Waldschlösschen 2**  
**W-4800 Bielefeld 15(DE)**

54 Transposon, dieses Transposon enthaltende Testvektoren und Verfahren zur Mutagenese.

57 Die Erfindung betrifft ein Transposon, bestehend aus einem Fragment des R-Plasmids pCxM82B aus *Corynebakterium xerosis* DSM 5021, mobilisierbare nicht selbst transferierbare Vektoren, die dieses Transposon enthalten und Verfahren zur Mutagenese von Gram-positiven Bakterien durch Transfer dieser Vektoren und Erzeugung von auxotrophen Mutanten.

EP 0 445 385 A2

Die Erfindung betrifft ein Transposon, bestehend aus einem Fragment des R-Plasmids pCxM82B, dieses Transposon enthaltende Testvektoren und Verfahren zur Mutagenese.

Ein Transposon enthält eine DNA-Sequenz, die für ein Protein kodiert, das es diesem Element ermöglicht, durch illegitime Rekombination in die DNA eines Chromosoms bzw. eines Plasmids unspezifisch zu integrieren. Weiterhin besitzt ein Transposon eine Selektionsmarkierung (z. B. ein Antibiotika-Resistenzgen), mit deren Hilfe man auf die Anwesenheit eines Transposons in einer Zelle selektionieren kann.

Dies ermöglicht die direkte Identifizierung von Integrationsmutanten und die Lokalisierung des betroffenen Gens im Genom. Die Isolierung eines Restriktionsfragments mit dem betroffenen Gen und dem inserierten Transposon kann dann nach dem Stand der Technik erfolgen.

Mit herkömmlichen Mutagenese-Verfahren (Hydroxylamin-Mutagenese bzw. NTG-Mutagenese) wird dagegen oft die Vitalität der Organismen negativ beeinflusst. Die schnelle Lokalisierung des mutierten Gens stellt bei diesem Verfahren ebenfalls ein großes Problem dar.

Die Technik der Transposon-Mutagenese wird bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien bereits erfolgreich eingesetzt. Beispielhaft sollen hier die Transposons Tn10 (9,3 Kb, Tc<sup>r</sup>) vom Plasmid R100 (Kleckner et al., 1981), Tn5 (5,7 kB, Km<sup>r</sup>) vom Plasmid JR67 (Berg et al., 1975) aus Gram-negativen und die Transposons Tn917 (5,1 Kb, Em<sup>r</sup>) vom Plasmid pAD2 (Tomich et al., 1980) und Tn916 (15 Kb, Tc<sup>r</sup>) aus dem Chromosom von *Streptococcus faecalis* DS16 aus Gram-positiven Bakterien erwähnt werden.

Das Transposon Tn917 wurde in *Bacillus* ssp sowie in anderen Gram-positiven und Gram-negativen Organismen (Kuramitsu and Casadaban, 1986) erfolgreich zur Erzeugung von auxotrophen Zellen sowohl des Aminosäurestoffwechsels als auch des Energiestoffwechsels eingesetzt (Perkins and Youngman, 1984; Vandeyar and Zahler, 1986, Mc Laughlin and Hughes, 1989).

Weiterhin werden Transposons zur Genomkartierung, zur Mobilisierung von Replikons, zur Erzeugung von Operon-Fusionen und zur Induktion von Genen (Simon et al., 1989) benutzt.

Die bekannten Transposon-Mutagenesesysteme eignen sich jedoch nicht für die gentechnische Veränderung von coryneformen Bakterien, insbesondere solchen, die Aminosäuren produzieren und ausscheiden.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein derartiges Transposon-Mutagenesesystem zur Verfügung zu stellen, das neue Möglichkeiten in der genetischen Analyse insbesondere von coryneformen Bakterien bietet.

Es wurde nun gefunden, daß ein bestimmtes Fragment des R-Plasmids pCxM82b Transposonaktivität zeigt.

Das R-Plasmid ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen nach dem Budapest Vertrag in *Corynebacterium xerosis* DSM 5021 hinterlegt und in der europäischen Patentanmeldung No. 89 120 459.6 (entspr. der deutschen Patentanmeldung P 38 41 454.6) beschrieben.

Die zirkuläre Karte ist in Abb. 1 enthalten.

Dieser sind auch die weiteren Kennzeichen des beanspruchten Fragments zu entnehmen:

- a) der für die Integration essentielle DNA-Bereich liegt zwischen den Koordinaten 30,4 - 44,8 Kb auf dem R-Plasmid,
- b) das Fragment wird an der Koordinate 30,4 Kb durch eine Sall-Schnittstelle und an der Koordinate 44,8 Kb durch eine HindIII-Schnittstelle begrenzt, und
- c) enthält für eine Tetracyclin- und Erythromycinresistenz codierende DNA-Abschnitte.

Die Transposonaktivität zeigt sich sowohl in Gram-positiven Bakterien, insbesondere in coryneformen Bakterien, wie z.B. *Corynebacterium* (C.) *glutamicum*, C. *xerosis*, C. *acetoacidophilum*, C. *herculis*, C. *lilium*, C. *melassecola* *Brevibacterium* (B.) *flavum*, B. *thiogenitalis*, B. *lactofermentum*, B. *roseum*, B. *saccharolitum*, insbesondere *Brevibacterium lactofermentum* DSM 20412, *Corynebacterium callunae* DSM 20147, *Corynebacterium herculis* DSM 20301, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Arthrobacter albidus* DSM 20128, wobei solche bevorzugt werden, die Aminosäuren produzieren und ausscheiden.

Das Transposon wird mit Hilfe eines geeigneten Trägerplasmids entweder durch Transformation oder durch Konjugation in den Rezipienten eingeführt. Dieses Trägerplasmid kann im Rezipienten nicht oder nur bei niedrigen Inkubationstemperaturen replizieren (temperatursensitive Replikation)

Besonders geeignet sind mobilisierbare, nicht selbsttransferierbare Vektoren (Testvektoren) die zusammengesetzt sind aus

- a) einem DNA-Segment, enthaltend ein in E.coli funktionelles Replikon,
- b) einem zweiten DNA-Segment, enthaltend die für die Mobilisierungs- und Transferfunktion codierenden DNA-Fragmente (Mob-site und ori T) und
- c) das Transposon

Zur Konstruktion derartiger Testvektoren werden mobilisierbare nicht selbsttransferierbare E.coli-Vektoren verwendet.

Der Begriff E.coli-Vektoren beinhaltet allgemein alle nur in E.coli-Stämmen selbständig replizierenden

Plasmide, die sich nach dem Stand der Technik als für gentechnologische Anwendungen nützlich erwiesen haben.

Beispiel solcher E.coli-Vektoren sind pMB9, pBR322, pBR325, pKB111, pUC8, pUC9, pACYC184, pACYC177, pSC101.

5 Diese und anderen Vektoren, die nur in Bakterienstämmen der E.coli-Gruppe replizieren, werden durch Insertion der Mob-site eines Plasmides mit weitem Wirtsbereich in Gram-negativen Bakterien modifiziert.

Bevorzugt wird das Plasmid RP4 für diese Zwecke verwendet. E.coli-Vektoren, die ein 1,9 Kb großes Fragment (Mob-site) von RP4 tragen, lassen sich in dem erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft einsetzen.

10 Als Mobilisatorstämme geeignet sind modifizierte E.coli-Stämme, die ein Plasmid im Chromosom integriert oder frei vorliegend enthalten, das in der Lage ist, die zur Mobilisierung notwendigen Funktionen bereitzustellen.

Es eignen sich insbesondere Stämme, in deren Chromosom ein RP4-Derivat integriert ist, dessen Transfer-Funktion in trans auf die Mob-site der oben genannten Vektoren einwirkt.

15 Geeignete Vektoren und E.coli Mobilisatorstämme sind aus der US-PS 4,626,504 bekannt und beim Northern Regional Research Center hinterlegt:

	<u>Stämme</u>	<u>NRRL-Hinterlegungsnummer</u>
20	E.coli CSH52/pSUP101	B - 15484
	E.coli CSH52/pSUP201	B - 15487
	E.coli CSH52/pSUP202	B - 15488
25	E.coli CSH52/pSUP203	B - 15489
	E.coli CSH52/pSUP301	B - 15492
	E.coli CSH52/pSUP401	B - 15494
	E.coli SM10	B - 15481
30	E.coli S68-7	B - 15482
	E.coli S17-1	B - 15483

# 35 Tabelle 1

Weitere Vektoren, wie pSUP102 oder pSUP205 sind aus der Literatur bekannt und werden nach analogen Verfahren  
40 aus bekannten Vektoren gewonnen (Simon et al., Methods of Enzymology 118, 640 ff (1986) und Biotechnology, November 1982)1.

45 Die unter Verwendung der genannten E.coli-Vektoren konstruierten, das Transposon enthaltenden Testvektoren werden durch Konjugation aus E.coli Mobilisatorstämmen in die Gram-positiven Bakterien gemäß einem Verfahren transferiert, wie es in der europäischen Patentanmeldung No. 89 120 473.7 (entspr. der deutschen Patentanmeldung P 38 41 453.8) beschrieben wird.

Der erfindungsgemäß konstruierte Testvektor pK1 (s. Abb. 2 und 3) besteht aus dem Transposon und  
50 einem durch eine HindIII- und eine SalI-Schnittstelle begrenzten Fragment des Vektors pSUP102 und hat eine Gesamtgröße von ~19,7 Kb.

Dabei stellt man restriktionsdefekte Zellen eines Gram-positiven Bakteriums her und mischt diese nach an sich bekannten Kreuzungsverfahren mit einem den mobilisierbaren Testvektor tragenden E.coli Mobilisatorstamm.

55 Während sich der Donor bevorzugt in der logarithmischen Wachstumsphase befindet, hat sich für den Zustand des Rezipienten die stationäre Wachstumsphase als günstig erwiesen.  
Donor- und Rezipientenzellen werden im allgemeinen im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 10, bevorzugt 1 : 1 bis 1 : 6 eingesetzt.

Der Restriktionsdefekt kann genetisch bedingt sein und z. B. durch mutagene Agentien (z. B. NTG:Methylnitronitrosoguanidin), erzeugt werden, er kann aber auch physiologisch bedingt sein, z. B. durch einen Hitzeschock.

Als besonders effektiv hat sich die Hitzebehandlung des Rezipienten unmittelbar vor der Kreuzung erwiesen. Dabei sind intakte oder sphäroplastierte Zellen einzusetzen.

Ein Hitzeschock für die Dauer von 1 bis 30 min, bevorzugt ca. 9 min, bei 45 bis 55 °C, bevorzugt ca. 49 °C, ermöglicht es, mit der sich daran anschließenden Steigerung der Transferfrequenz die Aufgabe der Erfindung zu erfüllen.

Die Konstruktion mobilisierbarer Vektoren wird ebenfalls in der europäischen Patentanmeldung No. 89 130 473.7  $\Delta$  EP-A-0375 889 beschrieben.

Zur Prüfung der Transposonaktivität inseriert man das ~14,4 Kb-Fragment des R-Plasmids in einen mobilisierbaren Vektor und führt dieses Konstrukt via Konjugation in ein coryneformes Bakterium, insbesondere ein Aminosäuren produzierendes, ein.

Bevorzugt wählt man ein Corynebakterium glutamicum aus.

Der in diesem Bakterium nicht replizierende erfindungsgemäße Testvektor geht in der Rezipientenzelle größtenteils verloren und mit ihm das inserierte DNA-Fragment des R-Plasmids.

Zum ersten Mal wurde aber nun gefunden, daß ein Transposon-Testvektor in das Chromosom eines als Rezipient dienenden coryneformen Bakteriums in merklichen Umfang integriert bzw., daß es zur Integration eines bestimmten DNA-Segments der R-Plasmid-DNA in das Chromosom des Rezipienten kommt (Transposition). Die Integrationen erfolgen an unterschiedlichen Stellen des Chromosoms.

Eine Untersuchung der unter Verwendung des Testvektors pK1 (Abb. 3) erhaltenen Integrationsmutanten zeigt, daß der Vektor pK1 nach Mobilisierung von E.coli nach C.glutamicum unspezifisch in das Chromosom des als Rezipienten gewählten Stammes C.glutamicum ATCC13032 integriert.

Bei den durchgeführten Transposon-Mutagenese Ansätzen wurden C.glutamicum-Zellen mit drei unterschiedlichen Auxotrophien gefunden (Al Leu<sup>-</sup>, AZ Trp<sup>-</sup>, A3 Ser<sup>-</sup>).

Voraussetzung für derartige Ereignisse ist das Vorhandensein eines Transposons bzw. eines Insertions-elements auf dem Testvektor. Der für diese Integration essentielle DNA-Bereich liegt auf dem DNA-Fragment des R-Plasmids pCxM82B, das ein Bestandteil dieses Testvektors ist.

Beispielteil

#### 1. Konstruktion des Tn-Testvektors pK1 (Graphische Darstellung s. Abb. 2 + 3)

Der mobilisierbare E.coli-Vektor pSUP102 (Simon et al., 1983) wurde mit dem Enzym Sall linearisiert. In der gleichen Weise wurde der E.coli-Vektor pSAIE2 (E.coli-Vektor pUC19 (Norrander et al., 1983) mit dem R-Plasmid-Fragment SalE2) vorbehandelt. Die Spaltungsansätze wurden gemischt und anschließend ligiert. Mit diesem Gemisch wurde dann E.coli S17-1 (Simon et al., 1983) transformiert. Es konnte aus den Transformanten ein Plasmid isoliert werden, welches Resistenz gegen Chloramphenicol (50 µg/ml) und Erythromycin (30 µg/ml) auf Agarplatten des Antibiotic-Medium No. 3 der Firma Oxoid verleiht. Dieses Plasmid genannt pK2 besteht aus dem Vektor pSUP102 mit dem 8,1 Kb-langen R-Plasmid-Fragment SalE2. Das Plasmid pK2 wurde mit HindIII linearisiert und anschließend religiert. Das Ligationsgemisch wurde nach E.coli S17-1 transformiert. Aus den Transformanten konnte das Plasmid pK2ΔHi (Vektor pK2 mit Deletion des HindIII-Fragments) isoliert werden. Das Plasmid pK2ΔHi wurde mit HindIII linearisiert und mit dem in gleicher Weise behandelten Vektor p2Hi4 (Plasmid PUC19 mit dem R-Plasmid-Fragment 2Hi4) gemischt und ligiert. Mit dem Ligationsgemisch wurde E.coli S17-1 transformiert. Aus den Transformanten konnte das Plasmid pK1 (Abb. 3) isoliert werden. Dieses Plasmid besteht aus einem Teil des E.coli-Vektors pSUP102 und einem ~14,4 Kb-Fragment des R-Plasmids pCxM82B und einer Gesamtgröße von ~19,7 Kb.

#### 2. Durchführung einer Transposon-Mutagenese mit dem Plasmid pK1 zur Erzeugung von auxotrophen C. glutamicum Zellen

Der Donor E.coli S17-1/pK1 wird 20 h in 10 ml LBGE<sub>50</sub> (Luria Broth mit 1 g/l Glucose (Maniatis et al., 1982) angezogen (Vorkultur).

Der Rezipient C.glutamicum ATCC 13032 wird über Nacht in 100 ml LBG bis zu einer optischen Dichte<sub>580</sub> = 4,0 angezogen.

100 ml LBGE<sub>50</sub> werden mit 1 ml der Donor-Vorkultur beimpft und bis zur optischen Dichte<sub>580</sub> = 1,0 angezogen.

15 ml der Rezipientenkultur werden für 9 Min. bei 49 °C inkubiert.



Donor- und Rezipientenkultur werden getrennt abzentrifugiert und gewaschen.

Nach der Resuspension werden Donorzellen und Rezipienten-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt.

Das Kreuzungsgemisch (im optimalen Volumen von 0,2 ml) wird auf NC-Filter (Nitrocellulose-Filter der Firma Sartorius) getropft, die zuvor auf LBGE<sub>m</sub> 0,2-Agarplatten gelegt werden.

Das Kreuzungsgemisch wird etwa 20 h bei 37 ° C im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgt die Selektion des Kreuzungsgemisches auf LBGN<sub>x50</sub>Em<sub>25</sub>. Nach 2 Tagen Inkubation der Platten bei 30 ° C können die Erythromycin-resistenten Kolonien auf LBGE<sub>m50</sub>. MME<sub>m50</sub> - (MM = Minimalmedium) Ebbinghausen et al., 1989) LBGTc<sub>10</sub> und LBGCm<sub>10</sub> übertragen werden.

#### Ergebnis

99 % der Integrationsmutanten sind resistent gegen Em, Tc und Cm (Resistenzgene des Vektors pK1; Em<sup>r</sup> und Tc<sup>r</sup> sind Resistenzgene des R-Plasmids pCxM82B; Cm<sup>r</sup> ist ein Resistenzgen des Vektors pSUP102), bei diesen Transkonjuganten ist der Vektor pK1 in das Chromosom integriert. Bei 1 % der Transkonjuganten ist nur eine Resistenz gegen Erythromycin feststellbar (Hier ist ein Teilbereich der R-Plasmid-DNA in das Chromosom integriert, auf diesem DNA-Bereich des R-Plasmids pCxM82B befindet sich das Em-Resistenzgen). Die unspezifische Integration des Vektors pK1 bzw. eines Teils des Vektors in das Chromosom von C.glutamicum konnte durch Hybridisierung chromosomaler DNA von Insertanten mit Digoxigenin-dUTP-markierter R-Plasmid-DNA nachgewiesen werden.

Die DNA-Markierung wurde mit dem "DNA Labeling and Detection Kit" von Boehringer Mannheim durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Der DNA-Transfer erfolgte nach der Methode von Southern (1975).

Pro Kreuzungsansatz werden unter den oben aufgeführten Bedingungen etwa 130 - 150 Transkonjuganten erhalten. Auxotrophe Zellen werden mit einer Frequenz von 0,5 % bis 1 % unter diesen Transkonjuganten gefunden.

Bei den bisher durchgeführten Transposon-Mutagenese Ansätzen wurden 3 auxotrophe C.glutamicum-Zellen (A1 Leu<sup>-</sup>, A2 Trp<sup>-</sup>, A3 Ser<sup>-</sup>) isoliert. Diese Zellen wachsen nicht auf MME<sub>m50</sub>. Zum Feststellen der Auxotrophie wurden diese Zellen nach der Methode von Holliday (Holliday, 1956) supplementiert.

Damit hat sich gezeigt, daß der Vektor pK1 nach Mobilisierung von E.coli nach C.glutamicum unspezifisch in das Chromosom von C.glutamicum integriert. Diese unspezifische Integration des R-Plasmid-Fragments ins Chromosom wurde durch Hybridisierung der Gesamt-DNA der Insertanten mit markierter R-Plasmid-DNA nachgewiesen. Die Fähigkeit der unspezifischen Integration ist an die Anwesenheit des ~14,4 Kb R-Plasmid-Fragments gebunden und wird mit dem Vorhandensein eines Transposons bzw. eines Insertionselementes erklärt.

#### Abkürzungen

C.glutamicum, Corynebakterium glutamicum; cm, Chloramphenicol; E.coli, Escherichia coli; Em, Erythromycin; Em<sub>25</sub>, 25 µg Erythromycin pro Milliliter Kulturmedium; Km, Kanamycin; Leu<sup>-</sup>, Leucin-Auxotrophie; LBG, Luria Broth mit 1g Glucose; ug, Mikrogrann; Nx, Nalidixinsäure; Nx<sub>50</sub>, 50 µg Nalidixinsäure pro Milliliter Kulturmedium; Nc, Nitrocellulose-Filter; pCxM82B, Plasmid aus dem Stamm Corynebakterium xerosis M82B; pK2ΔHi, Plasmid pK2 mit einer Deletion des internen HindIII-Fragments; R-Plasmid, Resistenz-Plasmid; Ser<sup>-</sup>, Serin-Auxotrophie; Tc, Tetracyclin, Tn, Transposon, Trp<sup>-</sup>, Tryptophan-Auxotrophie

#### Literatur

Berg et al., 1975, Proc.Natl.Acad.Sci., US 72, 3628ff Ebbinghausen et al., 1989 Arch. Microbiol. 151, 238ff Holliday, 1956 Nature 4540, 987 Kleckner et al., 1981 Ann.Rev.Genet.15, 341ff Kuramitsu and Casadaban, 1986, J.Bact. 167, 711f Maniatis et al., 1982 Molecular cloning, Cold Spring Harbor Lab. Maria do Carmo de Freire Bastos and Ellen Murphy, 1988 EMBO Journal 7, 2935ff Mc Laughlin and Hughes, 1989, J.Gen.Microbiol., 135, 2329ff Norrander et al., 1983, Gene 26, 101ff Perkins and Youngman, 1984, Plasmid 12, 119ff Simon et al, 1983, Biotechnology 1; 1983, Methods in Enzymology 118, 641-659 Simon et al, 1989, Gene 80, 161ff Southern, 1975, J.Mol.Biol. 98, 503ff Tomich et al., 1980 J.Bact. 141, 1366ff

Vandeyar and Zahler, 1986 J.Bact. 167, 530ff

# Patentansprüche

- 5 1. Transposon, bestehend aus einem Fragment von ~14,4kB des R-Plasmids pCxM82B, welches enthalten ist in Corynebakterium xerosis DSM 5021, bei dem der für die Integration essentielle DNA-Bereich zwischen den Koordinaten 30,4 - 44,8 kB auf dem R-Plasmid liegt, das durch eine Sall-Schnittstelle (Koordinate 30,4 Kb) und eine HindIII-Schnittstelle (Koordinate 44,8 Kb) begrenzt wird und für eine Tetracyclin- und eine Erythromycinresistenz codierende DNA-Abschnitte aufweist.
- 10 2. Mobilisierbarer, nicht selbsttransferierbarer Vektor (Testvektor), zusammengesetzt aus:  
a) einem DNA-Segment, enthaltend ein in E.coli funktionelles Replikon,  
b) einem zweiten DNA-Segment, enthaltend für die Mobilisierungs- und Transferfunktionen codierende DNA-Fragmente (Mob-site und ori T) und  
15 c) das Transposon gemäß Anspruch 1.
3. Testvektor gemäß Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein 1,9 Kb großes DNA-Fragment (Mob-site) des Plasmids RP4 trägt.
- 20 4. Testvektor gemäß Anspruch 2 oder 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß man den E.coli Vektor aus der Gruppe pSUP101, pSUP102, pSU201, pSUP 202, pSUP203, pSUP205, pSUP301, pSUP401 auswählt.
- 25 5. Testvektor pK1 gemäß Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, daß er eine Größe von ~19,7 Kb aufweist und aus dem Transposon und einem durch eine HindIII- und eine Sall-Schnittstelle begrenzten Fragment des Vektors pSUP102 von ~5,3 Kb Länge besteht.
- 30 6. Verfahren zur Mutagenese eines Gram-positiven Bakteriums,  
dadurch gekennzeichnet, daß man das Transposon mit Hilfe eines Trägerplasmids durch Transformation in den Rezipienten einführt, wobei sich das Trägerplasmid dort nicht oder nur bei niedrigen Inkubationstemperaturen repliziert.
- 35 7. Verfahren zur Mutagenese eines Gram-positiven Bakteriums durch konjugativen Transfer von mobilisierbaren Vektoren aus E.coli Mobilisatorstämmen, dadurch gekennzeichnet, daß man restriktionsdefekte Zellen des Gram-positiven Bakteriums herstellt und diese nach an sich bekannten Verfahren mit einem den mobilisierbaren Vektor, in dem das Transposon enthalten ist, tragenden E.coli Stamm kreuzt.
- 40 8. Verfahren gemäß Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet, daß man den Testvektor pK1 verwendet.
9. Gram-positives Bakterium, insbesondere coryneformes Bakterium, transformiert durch einen das Transposon tragenden Testvektor.
- 45 10. Gram-positives Bakterium, insbesondere coryneformes Bakterium, transformiert durch den Testvektor pK1.
- 50 11. Gram-positives Bakterium gemäß Anspruch 10 mit einer durch die Transformation erzeugten Auxotrophie.

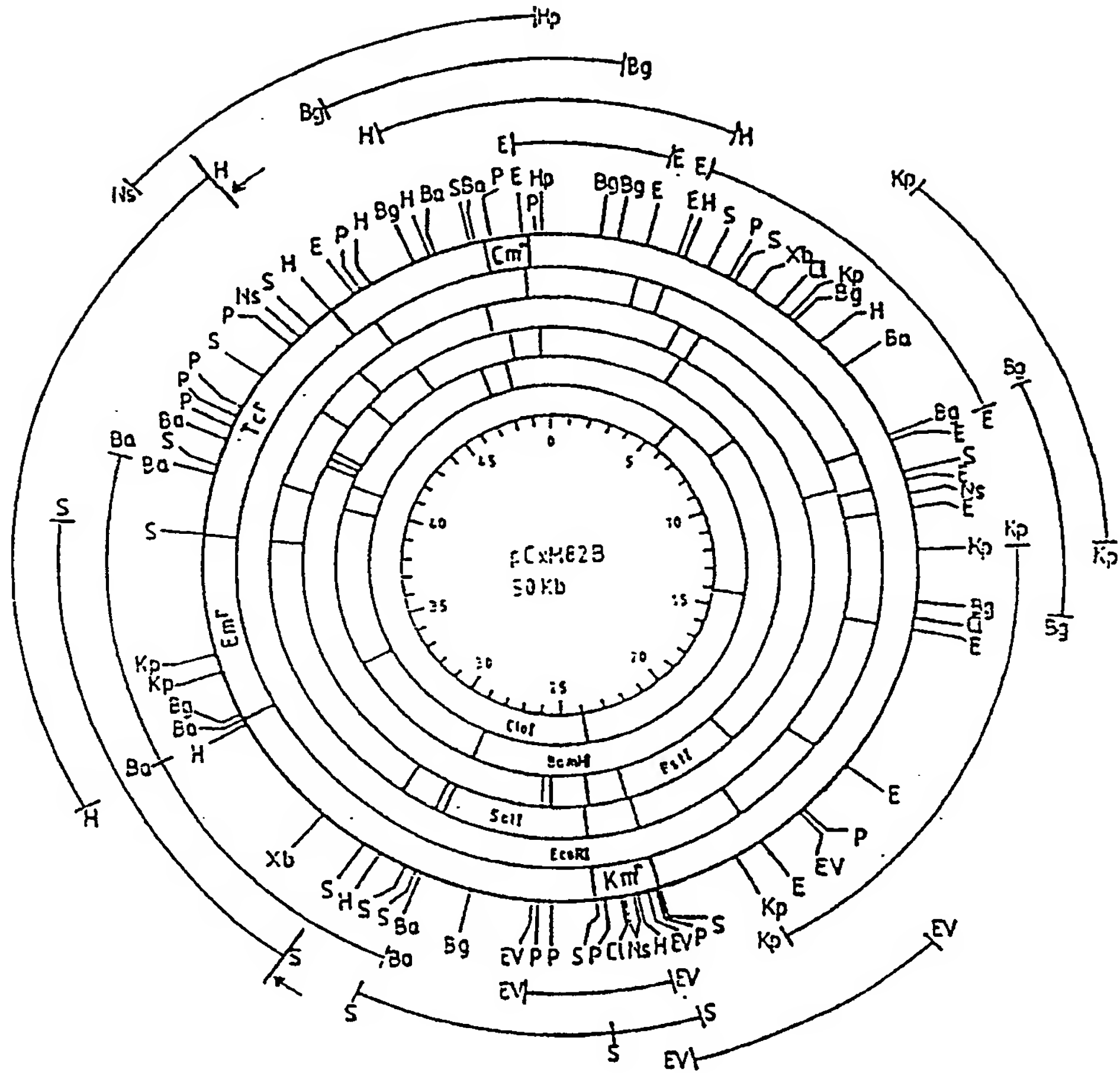


Abb.1 Restriktionskarte des R-Plasmids pCxM82B

Abkürzungen Ba, BamHI; Bg, BglII; Cl, ClaI; E, EcoRI; EV, EcoRV;  
H, HindIII; Kp, KpnI; Ns, NsiI; P, PstI; S, SalI; Xb, XbaI; Hp,  
HpaI

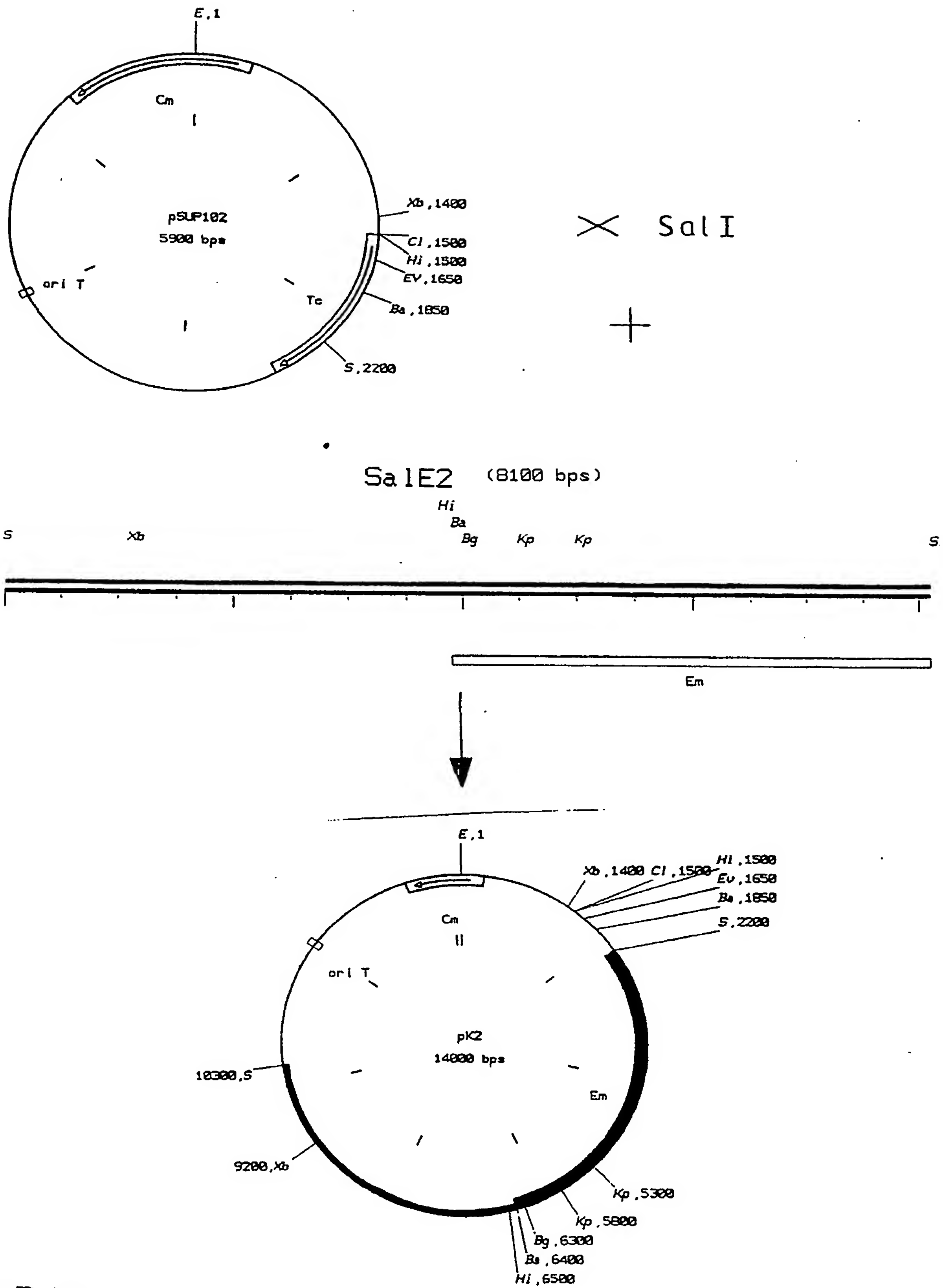
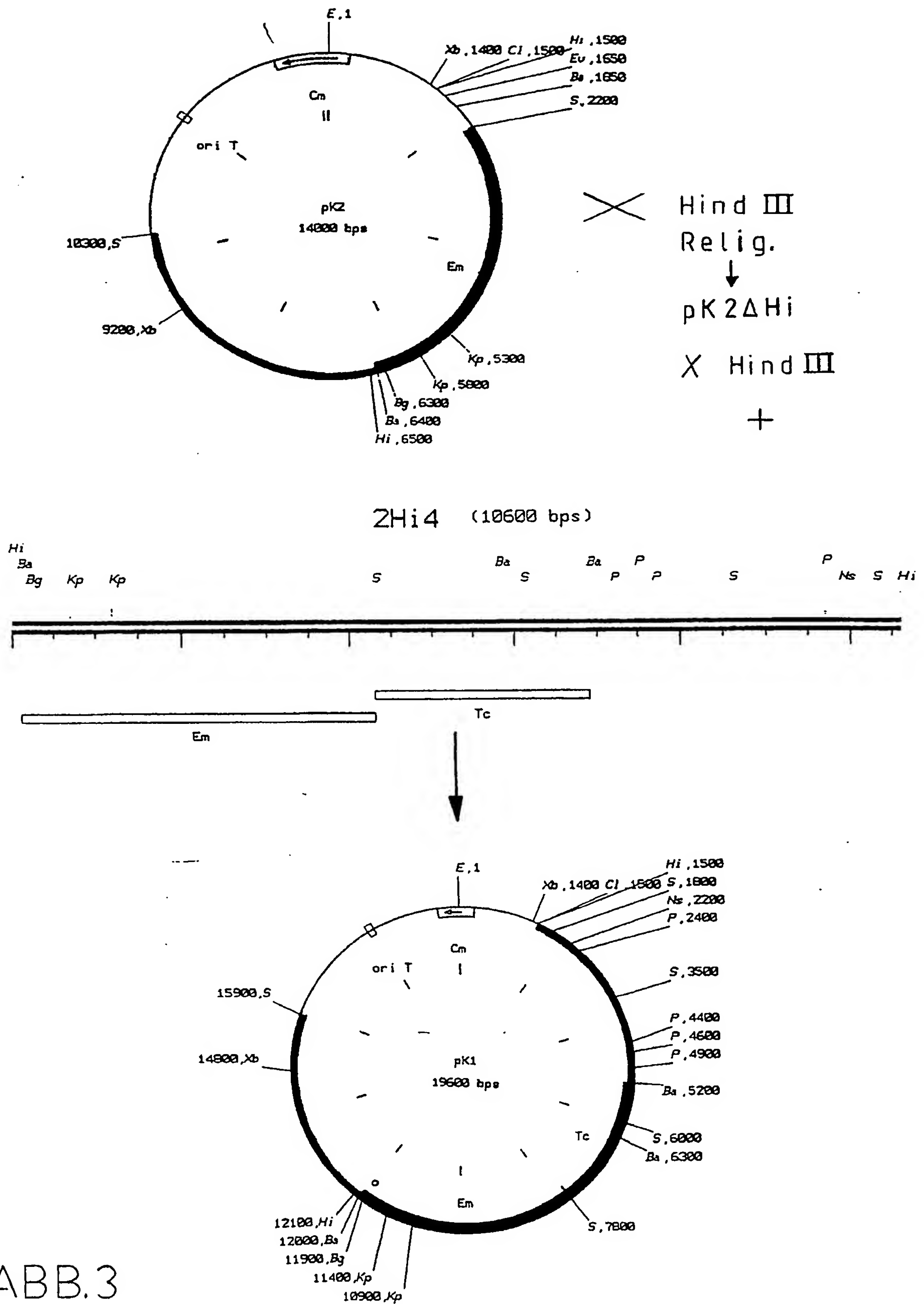


ABB.2





①



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 445 385 A3**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑪ Anmeldenummer: 90123263.7

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 15/77, C12N 15/74,  
C12N 15/70**

⑫ Anmeldetag: 05.12.90

⑬ Priorität: 03.03.90 DE 4006637

⑭ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
11.09.91 Patentblatt 91/37

⑮ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

⑯ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 06.11.91 Patentblatt 91/45

⑰ Anmelder: **Degussa Aktiengesellschaft**  
Weissfrauenstrasse 9  
W-6000 Frankfurt am Main 1(DE)

⑱ Erfinder: **Kassing, Friedrich**  
Körnerstrasse 4  
W-4830 Gütersloh 1(DE)  
Erfinder: **Schäfer, Andreas**  
Bünderstrasse 33  
W-4800 Bielefeld 1(DE)  
Erfinder: **Kalinowski, Jörn, Dr.**  
Schlosshofstr. 123  
W-4800 Bielefeld 1(DE)  
Erfinder: **Pühler, Alfred, Prof. Dr.**  
Am Waldschlösschen 2  
W-4800 Bielefeld 15(DE)

⑳ **Transposon, dieses Transposon enthaltende Testvektoren und Verfahren zur Mutagenese.**

㉑ Die Erfindung betrifft ein Transposon, bestehend aus einem Fragment des R-Plasmids pCxM82B aus *Corynebakterium xerosis* DSM 5021, mobilisierbare nicht selbst transferierbare Vektoren, die dieses

Transposon enthalten und Verfahren zur Mutagenese von Gram-positiven Bakterien durch Transfer dieser Vektoren und Erzeugung von auxotrophen Mutanten.

EP 0 445 385 A3

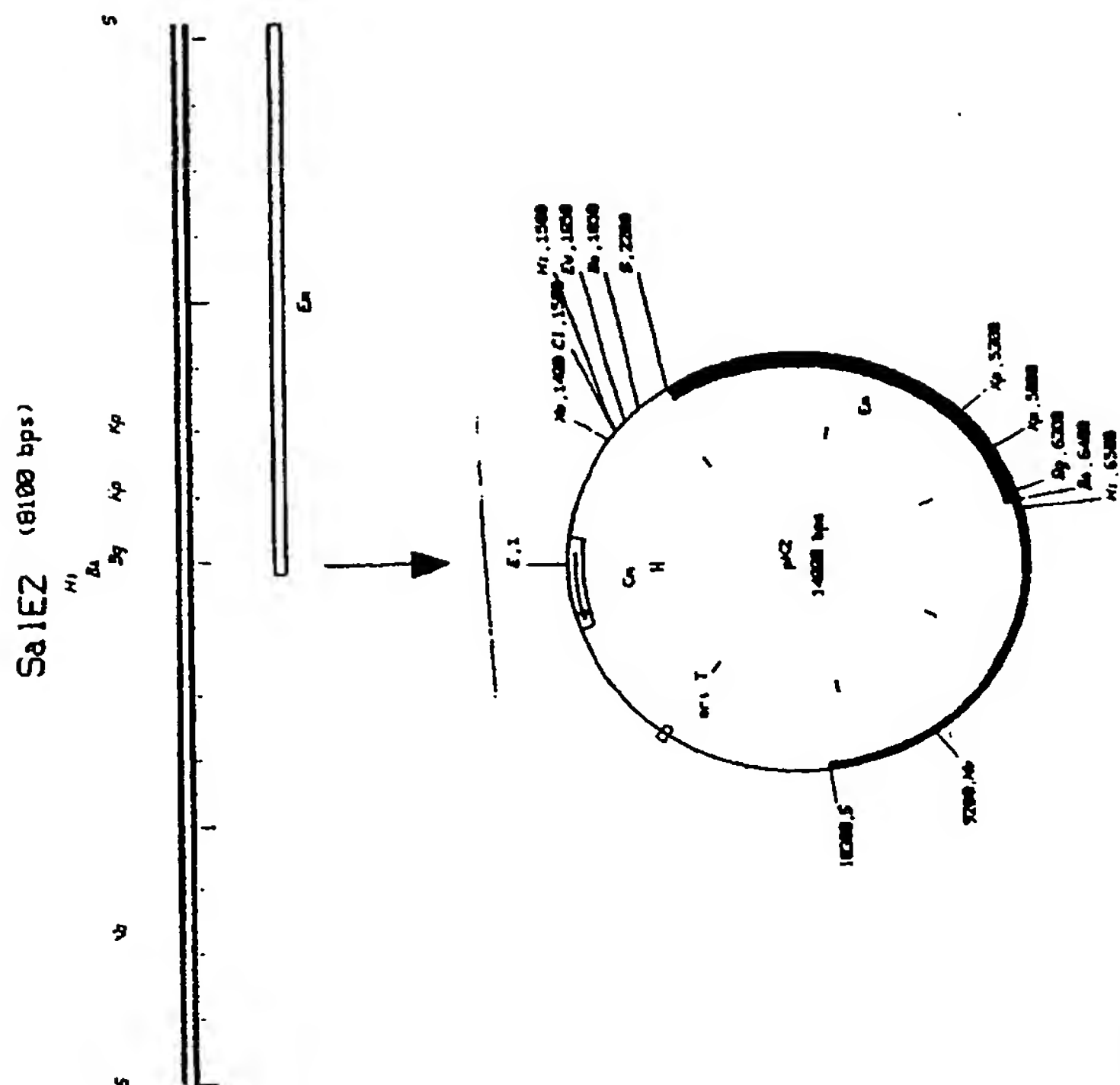
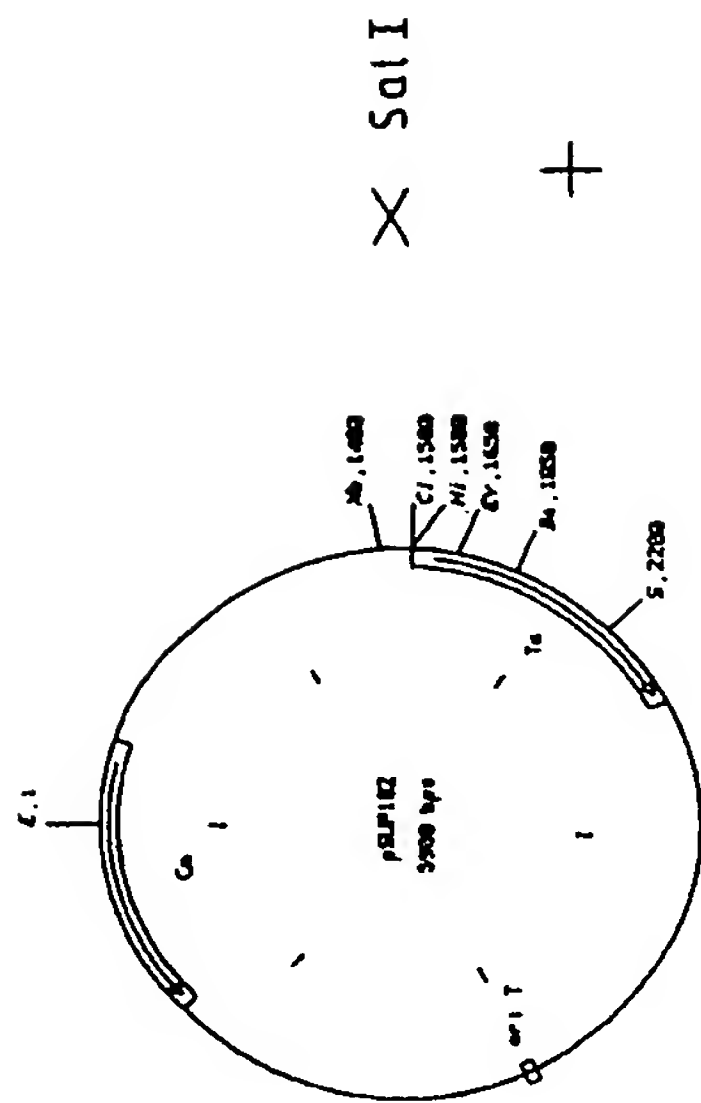


ABB.2



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 12 3263

Seite 1

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA Bd. 80, April 1983, WASHINGTON, USA Seiten 2305 - 2309; P. J. YOUNGMAN ET AL.: 'Genetic transposition and insertional mutagenesis in Bacillus subtilis with Streptococcus faecalis transposon Tn917' * Seite 2307, linke Spalte, Zeile 3 - Zeile 28 *	6,9	C12N15/74 C12N15/77 C12N15/70
Y	---	7	
Y	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Bd. 172, Nr. 3, März 1990, BALTIMORE, USA Seiten 1663 - 1666; A. SCHÄFER ET AL.: 'High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative Escherichia coli to various gram-positive coryneform bacteria' * Seite 1663, rechte Spalte, Zeile 30 - Seite 1665, linke Spalte, Zeile 17 * * Abbildung 1 *	2,3,7	
P,Y	EP-A-375 889 (DEGUSSA AKTIENGESellschaft) 4. Juli 1990 * Seite 3, Zeile 38 - Zeile 46 * * Seite 5, Zeile 17 - Seite 6, Zeile 24 *	2,3	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Bd. 148, 1981, BALTIMORE, USA Seite 143; G. A. BUCK & N. B. GROMAN: 'Genetic elements novel for Corynebacterium diphtheriae: Specialized transducing elements and transposons' * Seite 143, rechte Spalte, Zeile 8 - Seite 144, linke Spalte, Zeile 24 * * Seite 149, linke Spalte, Zeile 6 - Seite 150, rechte Spalte, Zeile 4 *	9	C12N
A	US-A-4 626 504 (A. PUHLER & R. SIMON) 2. Dezember 1986 * Anspruch 1 *	2,3	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemarkt DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 06 SEPTEMBER 1991	Prüfer THIELE U.H.C.H.
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 (12.12.1988)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 12 3263  
Seite 2

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
A	--- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Band 10, Nr. 43 (C-329)[2100], 20. Februar 1986; & JP-A-60 192 586 (Kyowa Hakko Kogyo K. K.) 01-10-1985; *Gesamte Zusammenfassung* -----	7	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 06 SEPTEMBER 1991	Prüfer THIELE U.H.C.H.
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur I : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			